

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11) Publication
number:

100218553 B1

(43) Date of publication of application:
10.06.1999(21) Application number: 1019970023370
(22) Date of filing: 05.06.1997

(71) Applicant:

KOREA GINSENG & TOBACCO RESEARCH EXPERIMENT STATION

(72) Inventor:

CHOI, GANG JU
KIM, MAN UK
KIM, SEOK CHANG
KIM, YEONG HUI
KO, SEONG RYONG
SUNG, HYEON SUN

(51) Int. Cl

C12P 19 /00

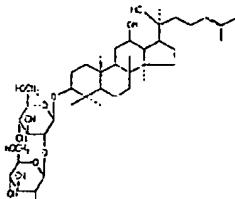
(54) PROCESS FOR PREPARING GINSENOSIDE RG3

(57) Abstract:

PURPOSE: An enzymatic preparing method of ginsenoside Rg3 from ginseng saponin mixture is provided, which is simple and can increase the productivity of 20(S)-ginsenoside Rg3.

CONSTITUTION: The mixture containing ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd or mixture thereof, ginseng saponin mixture or ginseng extract reacts with lactase isolated from *Aspergillus* sp. or *Penicillium* sp. in the aqueous solvent such as water or buffer to produce 20(S)-ginsenoside Rg3 in high yields. The physico-chemical properties of 20(S)-ginsenoside

RG3 represented by the formula (I) are the followings: color-less micro crystalline in isopropanol of 90%; melting point = 248-250 deg.C; Rf value = 0.53 in chloroform: ethanol: water (65:35:10).



(I)

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19970605)

Notification date of refusal decision ()

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (19990311)

Patent registration number (1002185530000)

Date of registration (19990610)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent ()

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

공고특허10-0218553

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)(51) Int. Cl. 6
C12P 19/00(45) 공고일자 1999년10월01일
(11) 공고번호 10-0218553
(24) 등록일자 1999년06월10일

(21) 출원번호	10-1997-0023370	(65) 공개번호	특1999-0000458
(22) 출원일자	1997년06월05일	(43) 공개일자	1999년01월15일
(73) 특허권자	재단법인한국인삼연초연구원 박명규 대전광역시 유성구 신성동 302		
(72) 발명자	고성룡 대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 113동 303호 최강주 대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 119동 1101호 김영희 대전광역시 유성구 어은동 99번지 한빛아파트 105동 1704호 김민욱 경기도 군포시 산본동 1092 장미아파트 1237동 1204호 성현순 대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 131동 1305호 김석창 대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 113동 306호		
(74) 대리인	백문구		
심사관 : 이처영			

(54) 진세노사이드 Rg3의 제조방법

요약

본 발명은 인삼 사포닌 혼합물로 부터 효소적방법에 의하여 진세노사이드 Rg₃를 대량으로 제조하기 위한 것임. 제조방법은 진세노사이드 Rb

1. Rb₂, Rc, Rd 등 프로토파낙사사이드를 사포닌이 함유된 사포닌 혼합물 또는 인삼 extract를 완충용액 중에서 효소 락타제와 반응시켜 제조함. 본 발명에 의하면 제조방법이 간단하고 20(S)-진세노사이드 Rg

₃의 수율을 현저하게 높일 수 있음.

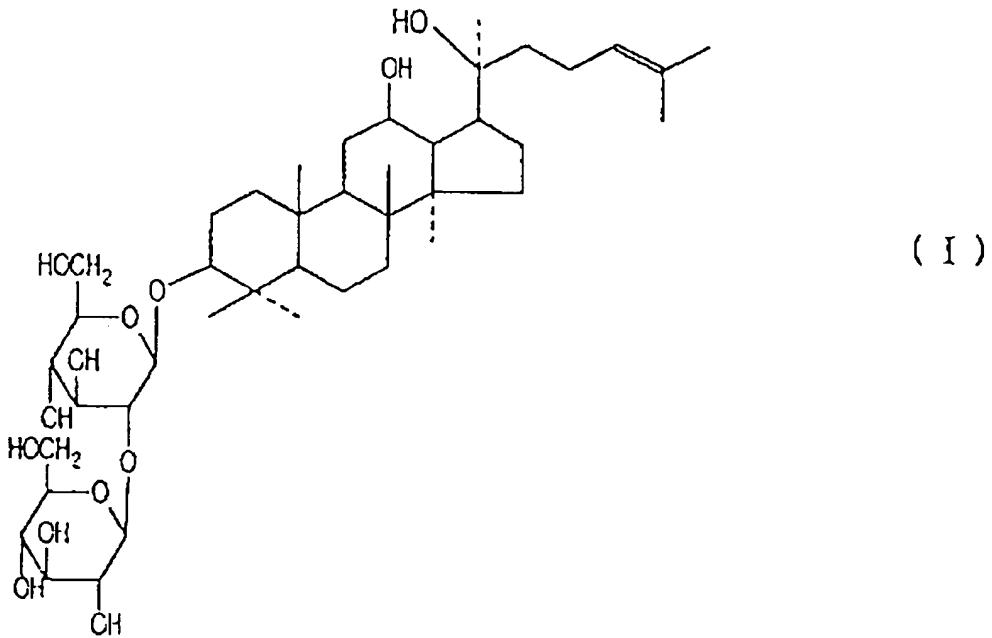
20(S)-진세노사이드 Rg₃는 암세포 전이 억제작용, 혈소판 응집 억제작용, 실험적 간장해 억제작용, 혈관 확장작용 및 항암제의 내성 억제작용이 있는 생리활성 물질임.

명세서

[발명의 명칭]진세노사이드 Rg₃의 제조방법[발명의 상세한 설명][발명의 목적]본 발명의 목적은 인삼에 다양으로 함유되어 있는 주요 다이올형 사포닌으로 부터 미량 사포닌인 진세노사이드 Rg₃를 단간하게 제조하는 방법에 관한 것이다.

[발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]본 발명은 다이올형 사포닌으로 부터 효소적방법에 의하여 다음 일반식 (I)으로 표시되는 20(S)-프로토파낙사사이드-3-O-베타-디-글루코피라노실(1→2)-베타-디-글루코피라노사이드 [진세노사이드 Rg₃]를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[화학식1]



상기 일반식(I)의 20(S)-진세노사이드 Rg₃는 임세포 전이 억제작용, 혈소판응집 억제작용, 항혈전작용, 실험적 간장해 억제작용, 혈관 이완작용 및 항알제의 내성 억제작용이 있는 성분으로 이미 알려져 있다.

인삼 특유의 약리활성 사포닌인 진세노사이드 유도체들은 다마란계의 트리테르페노이드인 프로토파낙사다이올과 프로파낙사트라이올에 글루코오스, 랍노스, 아라비노스 또는 자일로스 같은 당류가 결합한 화합물들로서 현재까지 고려 인삼에서 30여종의 유도체들이 밝혀져 있다. 또한 인삼 사포닌은 아글리콘에 결합되어 있는 당의 종류나 결합된 당류의 수 또는 결합위치에 따라 약리효능이 각각 다르다는 것이 이미 밝혀져 있으며, 특히 수삼이나 백삼에 함유되어 있는 주요 사포닌의 약리효능에 대해서는 많은 연구가 행해졌으나 주로 흥삼에만 존재하는 미량사포닌의 약리효능에 관한 연구는 상대적으로 적은 편이다.

흥삼은 수삼을 수증기 처리하여 제조하는데 이 과정에서 구조적으로 불안정한 진세노사이드의 아글리콘 C-20위치에 결합되어 있는 배당체결합이 쉽게 가수분해됨과 동시에 수산기가 반전 평형을 일으켜 C-20(R)과 C-20(S)의 이성체가 생성된다. 따라서 흥삼에는 프로사포게닌인 20(R&S)-진세노사이드 Rg

2, Rg₃, Rh₁ 및 Rh₂가 수삼이나 백삼에 비해 월등히 많이 함유되어 있으며, 특히 진세노사이드 Rg₃는 백삼에 비해 흥삼에 약 50배 가량 많이 함유되어 있다. 이와같이 미량사포닌은 화학적인 방법 즉, 초산분해에 의해서도 제조할 수 있으나 이 방법은 제조과정에서 C-20(R)과 C-20(S) 이성체 혼합물의 생성, 털수, 히드록실화 반응과 같은 바람직하지 못한 부반응을 동반하기 때문에 생성물을 순수 분리하는데 많은 어려움이 있을 뿐 아니라 수율이 극히 낮은 문제점이 있다(예를들면 대한민국 특허 제 4066호, 제8291호).

[발명이 이루고자 하는 기술적 과제] 본 발명은 인삼에 다양으로 함유되어 있는 주요 다이올형 사포닌인 진세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 또는 이들을 함유하는 혼합물을로부터 미량 사포닌인 진세노사이드 Rg₃를 간단하게 제조하기 위한 것이다.

전술한 본 발명의 목적은 인삼의 주요 다이올형 사포닌인 진세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 또는 이들을 함유하는 혼합물을 미생물에서 분리한 락타제와 함께 반응시키는 방법에 의하여 달성된다.

본 발명은 진세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 또는 이들을 함유하는 혼합물을 물, 완충용액과 같은 수성용매 또는 수성용매의 유기용매의 혼합액 중에서 효소와 함께 반응시키는 방법으로 구성된다. 본 발명의 방법에 의하여 진세노사이드 Rb

1, Rb₂, Rc, Rd 또는 이들을 함유하는 혼합물을 물, 완충용액과 같은 수성용매 또는 수성용매와 유기용매의 혼합액 중에서 효소와 함께 반응시키면 단기간 내에 C-20위치의 배당체결합이 선택적으로 절단되어 천연형인 20(S)-진세노사이드 Rg₃가 고수율로 생성된다.

본 발명에 사용되는 용매로는 물, 완충용액과 같은 효소의 활성을 저하시키지 않는 수성용매를 사용하는 것이 좋다. 가

장 바람직한 수성용매로는 pH 4~8, 특히 pH 4~6 범위의 완충용액이 바람직하다. 전술한 수성용매는 단독으로 사용할 수도 있으나 다른 수성용매 및 유기용매와 혼합하여 사용할 수도 있는데, 혼합하여 사용할 수 있는 유기용매는 물과 혼화되면서 효소의 활성을 저하시키지 않는 것이어야 한다. 바람직한 유기용매로는 아세토니트릴, 디옥산, 디메틸 셀록사이드, 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 등이 있으며, 유기용매의 사용량은 사용한 기질을 기준으로 1~50% 농도, 특히 2~30% 농도가 되도록 하는 것이 바람직하다.

본 발명에 사용되는 효소로는 아스퍼질러스 또는 페니실리움속에서 분리한 락타제가 있으며, 이러한 효소의 첨가방법은 효소의 물활성화가 일어나지 않는 방법이라면 특별히 제한을 받지 않는다.

반응온도는 효소의 불활성화가 일어나지 않는 온도조건이어야 하는데, 수성용매만을 사용하는 경우는 60

°C

이하가 바람직하고, 수성용매와 유기용매의 혼합액을 사용하는 경우는 40

°C

이하가 바람직하다. 본 발명에 사용되는 반응시간 역시 효소의 활성이 유지되는 기간이라면 특별히 제한을 받지 않으나 1~72시간, 바람직하게는 24~48시간이 적당하다.

본 발명에 의한 20(S)-진세노사이드 Rg₃ 제조방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

전세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 또는 이들의 혼합물을 수성용매 또는 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시키고 아스퍼질러스속 또는 페니실리움속에서 분리한 락타제를 가하고 20~60

°C

에서 1~72시간 반응시킨 후 비등 수육조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켜 천연형의 20(S)-진세노사이드 Rg₃가 다량으로 함유된 반응액을 얻는다. 이와같은 효소적방법에 의하면 종래 화학적방법을 사용하는 경우보다 수율이 높고 단기간 내에 반응이 이루어지며 20(S)형의 진세노사이드 유도체만이 생성되기 때문에 분리하기가 용이하다. 본 발명에 의해 제조된 생성물은 다음과 같은 물리화학적 성상을 나타내어 이를 20(S)-진세노사이드 Rg

₃로 동정하였다.

[20(S)-진세노사이드 Rg₃의 물리화학적 성상]성상 : 무색 미세 결정(90% 이소 프로판올)녹는점 : 248~250

°C

[α]_D²⁴ +16.5° (c=1.00, MeOH)

Rf값 : 키젤겔 60 F₂₅₄ 박층크로마토그래피를 이용하여 클로로포름-메탄올-물 = 65:35:10(아래층)으로 전개하였을 때 0.53

적외선 분광 스펙트럼(cm⁻¹) : 3420(히드록실), 1636(올레피닉)고속 원자 충격 질량 스펙트럼 : m/z 786(M+)⁺

수소 핵자기공명 스펙트럼(δ) : 4.94(1H, d, J=7.50 Hz, β -아노머릭),

5.38(1H, d, J=7.62 Hz, β -아노머릭)

탄소 핵자기공명 스펙트럼(δ) : 15.7, 16.3, 16.5, 16.9, 17.6, 18.3, 22.9, 25.7,

26.6, 26.8, 27.0, 28.0, 31.2, 32.0, 35.1, 35.8, 36.8, 39.0, 39.6, 39.9,

48.5, 50.3, 51.6, 54.7, 56.3, 62.6, 62.7, 70.9, 71.5, 71.5, 72.9, 77.1,

77.8, 78.0, 78.2, 78.2, 83.3, 88.8, 105.0, 106.0, 126.2, 130.7

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

[실시예][실시예 1]진세노사이드 Rb, 1g을 0.1M 초산완충용액(pH 4.5)에 용해시켜 전체를 50ml로 정용한 다음 여기에 아스퍼질러스속에서 분리한 락타제 5g을 첨가하여 37

°C

수육조상에서 교반하면서 48시간 반응시킨다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여 기질이 완전히 소실되면 열수증에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 수포화부탄올로 추출, 농축하여 20(S)-진세노사이드 Rg

₃가 75% 이상 함유된 분말상 반응생성물을 얻었다.

[실시예 2]진세노사이드 Rb₂ 1g을 초산완충용액(pH 4.8)에 용해시켜 전체를 50ml로 정용한 다음 여기에 페니실리움 속에서 분리한 락타제 3g을 첨가하여 37

°C

수육조상에서 교반하면서 72시간 반응시킨다. 반응액은 열수증에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축하여 20(S)-진세노사이드 Rg

₃가 75% 이상 함유된 분말상 반응생성물을 얻었다.

[실시예 3]진세노사이드 Rc 1g을 초산완충용액(pH 5.0)에 용해시켜 전체를 50ml로 정용한 다음 여기에 페니실리움 속에서 분리한 락타제 5g을 첨가하여 50

°C

수육조상에서 교반하면서 72시간 반응시킨다. 반응액은 열수증에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축하여 분말상의 반응생성을 710mg을 얻었다.

[실시예 4]진세노사이드 Rd 1g을 시트레이트 완충용액(pH 5.0)에 용해시켜 전체를 50ml로 정용한 다음 여기에 페니실리움 속에서 분리한 락타제 4g을 첨가하여 50

°C

수육조상에서 교반하면서 72시간 반응시킨다. 반응액은 열수증에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축한다. 농축액은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=65:35:10)에 의해 20(S)-진세노사이드 Rg

₃ 564mg를 얻었다.

[실시예 5]진세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 의 동량 혼합물 1g을 초산완충용액(pH 5.0)에 용해시켜 전체를 50ml로 정용한 다음 여기에 아스퍼질러스속에서 분리한 락타제 5g을 첨가하여 50

°C

수육조상에서 교반하면서 72시간 반응시킨다. 반응액은 열수증에서 가열하여 반응을 종료시킨 다음 다이아이온 HP-20 수지를 충진한 컬럼에 흡착시킨 후 당류와 효소는 증류수로 세척하여 제거하고 반응생성물은 메탄올로 응출시켜 농축한다. 농축액은 실리카겔 컬러 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=65:35:10, 히총)에 의해 20(S)-진세노사이드 Rg

₃ 520mg를 얻었다.

[실시예 6]다이올계 사포닌이 주로 함유된 인삼근에서 분리한 조사포닌 분획 1g에 초산 완충용액(pH 5.0)에 용해시켜 전체를 50ml로 정용한 다음 여기에 아스퍼질러스속에서 분리한 락타제 3g을 첨가하여 37

°C

의 수육조상에서 교반하면서 48시간 반응시킨다. 반응액은 열수증에서 가열하여 반응을 종료시킨 다음 수포화 부탄올로 추출후, 김입농축한다. 농축액은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=65:35:10, 하총)에 의해 20(S)-진세노사이드 Rg

₃ 426mg를 얻었다.

[실시예 7]인삼 추출액스 1g을 물에 용해시켜 전체를 50ml로 정용한 다음 여기에 페니실리움 속에서 분리한 락타제 2g을 첨가하여 37

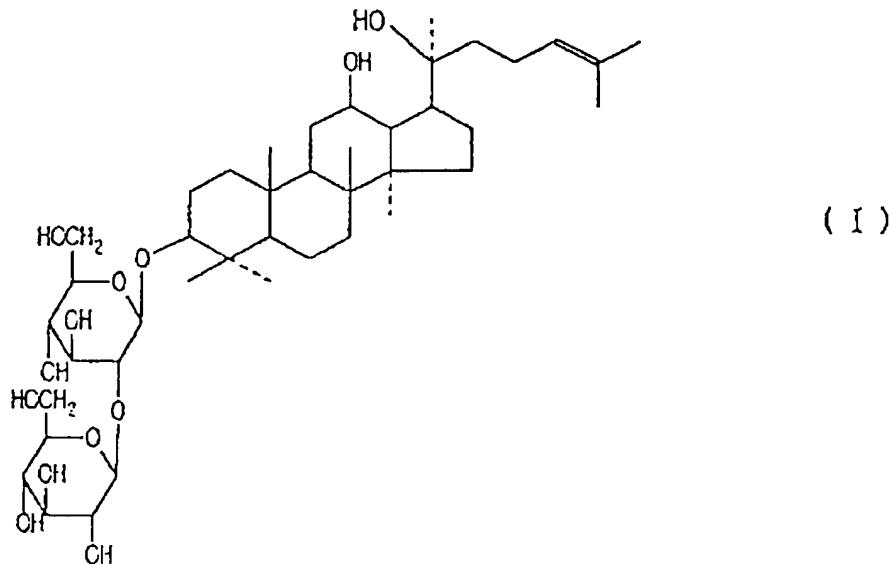
°C

에서 48시간 반응시킨다. 반응액은 열수중에서 가열하여 효소를 불활성시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축한다. 농축액은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=65:35:10, 하층)로 분리하여 20(S)-진세노사이드 Rg₃가 40% 이상 함유된 분말상 반응생성물을 얻었다.

(57) 청구의 범위

청구항1

다이올형 사포닌을 수성용매중에서 효소 락타제와 반응시켜 일반식(I)으로 표시되는 20(S)-진세노사이드 Rg₃를 제조하는 방법.



(I)

청구항2

제1항에서, 다이올형 사포닌이 진세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 및 이들을 함유하는 혼합물중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항3

제1항에서, 다이올형 사포닌이 인삼을 추출 분리하여 얻은 인삼 사포닌 혼합물 및 인삼추출 엑스 중의 하나에 함유된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항4

제1항에서, 락타제가 아스퍼자스속과 페니실리움속 중의 하나에서 분리한 효소임을 특징으로 하는 방법.

청구항5

제1항에서, 음매가 완충용액과 물중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항6

제1항에서, 용매가 아세톤, 아세토니트릴, 디옥산, 디메틸су 폴사이드, 저급알콜중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항7

제1항에서, 음매가 수성용매와 유기용매의 혼합물이며, 유기용매는 수성용매의 중량을 기준으로 하는 30% 이하로 사

용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항8

제1항에서, 반응이 10~50

°C

범위에서 진행됨을 특징으로 하는 방법.

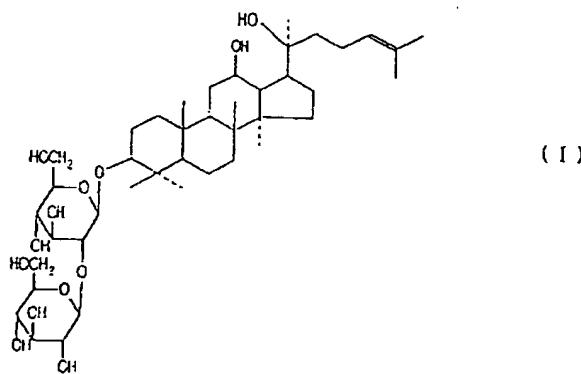
(5) KR 0218553 (KOREA GINSENG & TOBACCO RESEARCH INSTITUTE)

Abstract

The present invention relates to a mass production of ginsenoside Rg3 from a ginseng saponin mixture by using an enzymatic method. The ginsenoside Rg3 is prepared by reacting a saponin extract containing protopanaxadiol saponin such as Rb1, Rb2, Rc, Rd and the like, or a ginseng extract with lactase in a buffer solution. This method of the present invention is very simple and can greatly improve the yield of 20(S)-ginsenoside Rg3. The 20(S)-ginsenoside Rg3 is a physiological material having inhibitory effects against metastasis of cancer cells, platelet agglutination, experimental liver disorders, vasodilation, and resistance of anticancer agents.

Claims

1. A method of preparing 20(S)-ginsenoside Rg3 represented by the following general formula (I)



by reacting diol type saponin with lactase in an aqueous solvent.

2. In claim 1, said diol type saponin is selected from the group consisting of Rb1, Rb2, Rc, Rd and a mixture thereof.
3. In claim 1, said diol type saponin is contained in a ginseng saponin mixture obtained by

separation of ginseng extract or a ginseng extract.

4. In claim 1, said lactase is an enzyme isolated from *Aspergillus* sp. or *Penicillium* sp.

5. In claim 1, said solvent is a buffer solution or water.

6. In claim 1, said solvent is selected from the group consisting of acetone, dioxane, dimethylsulfoxide, and low grade alcohol.

7. In claim 1, said solvent is a mixture of an aqueous solvent and an organic solvent, wherein said organic solvent is used in the range of less than 30 wt% based on the weight of said aqueous solvent.

8. In claim 1, said reaction is performed in the range of 10-50 °C.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.